1929. Strelin, G. S. *Röntgenologische Untersuchungen an Hydren.* (Archiv f. Entw. Mech. 115, p. 27.)

1929. Zawarzin, A. *Röntgenologische Untersuchungen an Hydren.* (Archiv f. Entw. Mech. 115, p. 1.)

No 11. **F. E. Lehmann** und **H. R. Dettelbach.** — Histostatische Wirkungen von Aminoketonen auf die Schwanzregeneration der *Xenopus*larve [1].

(Mit 2 Textabbildungen.)

Aus der Abteilung für Zoophysiologie des Zoologischen Instituts der Universität Bern.

1. Cytoklastische und histostatische Stoffwirkungen bei der experimentellen Hemmung von Regenerationsvorgängen

Die Regeneration des amputierten Schwanzes der Kaulquappe von *Xenopus laevis* lässt sich mit verschiedenen Substanzen teilweise oder völlig hemmen. Die histologische und die statistische Analyse verschiedener Stoffwirkungen zeigt sehr deutlich (Lehmann und Bretscher 1952), dass der Regenerationsprozess durch verschiedenartige Einwirkungen blockiert werden kann. Wie bei den meisten Formen gliedert sich der Regenerationsprozess auch bei *Xenopus* in drei gut unterscheidbare Phasen (s. u. a. Lüscher 1952):

1. *Die Phase der Aktivierung der Blastembildung*, die unmittelbar auf die Amputation folgt. Dabei entstehen Blasteme gewebsspezifischer embryonaler Zellen aus den Wundflächen der amputierten Organe, ohne dass zunächst Zellteilungen auftreten.

---

[1] Ausgeführt mit Unterstützung d. Eidg. Kommission zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung aus Arbeitsbeschaffungsmitteln des Bundes.

2. Nach 2—3 Tage setzt *das Wachstum der Blasteme* ein und damit erscheinen zahlreiche Mitosen, zunächst in den Geweben des Stumpfes und dann in den angrenzenden Blastemen.

3. Vom 6.—10. Tag schliesslich *differenzieren sich* die regenerierenden Blasteme zu den *charakteristischen Gewebeformen* der Achsenorgane.

Eine weitgehende Hemmung der Regeneration kann nun durch chemische Beeinflussung nur einer der drei Hauptphasen herbeigeführt werden. Nach Lüscher (1946) trifft das Colchicin in erster Linie das Wachstum der Blasteme, indem hier die mitosebereiten Zellen in die Mitose getrieben werden, dann stehen bleiben und schliesslich zu Grunde gehen, ohne die Interphase erreicht zu haben. Colchicin hemmt also die Regeneration durch cytoklastische Effekte in der Wachstumsphase, während die erste Phase der Blastembildung und die letzte der Histogenese durch die Colchicinwirkung nicht wesentlich verändert wird.

Ganz anders wirken nach unseren Befunden gewisse Aminoketone (Lehmann, Bretscher, Kühne, Sorkin, Erne und Erlenmeyer 1950). Sie greifen in die erste Phase des Regenerationsprozesses, die Blastembildung, ein (Lehmann und Bretscher 1952), ohne dass dadurch der Mitoseablauf wesentlich beeinflusst würde. Demnach handelt es sich hier in erster Linie um histostatische Effekte, d. h. um eine generelle Hemmung der Leistungen der beteiligten Zellverbände bei der Aktivierung. Im folgenden sei eine kurze Charakterisierung und Erörterung dieser Erscheinungen gegeben, die sich auf detaillierte Befunde des einen von uns stützt (Dissertation H. R. Dettelbach).

2. Die Hemmung der Blastemaktivierung durch Aminoketone.

Für die Experimente wurden zwei Aminoketone verwendet, die dem Leucin strukturanalog sind.

Aminoketon 5

$$\begin{array}{l} CH_3-CH-CH_2-CH-CO-CH_3 \\ \qquad\quad | \qquad\qquad\quad | \\ \qquad CH_3 \qquad\quad NH_2,\ HCl \end{array}$$

Aminoketon 9

$$\begin{array}{l} CH_3-CH-CH_2-CH-CO-C_2H_5 \\ \qquad\quad | \qquad\qquad\quad | \\ \qquad CH_3 \qquad\quad NH_2,\ HCl \end{array}$$

Aus diesen Körpern entstehen nach unseren Befunden (LEHMANN, WEBER und AEBI unveröff.) in wässeriger Lösung die Verbindungen, die als die eigentlichen biologisch aktiven Körper anzusprechen sind. Die amputierten Larven kamen in Lösungen der Aminoketone, angemacht in destilliertem Wasser in einer Konzentration von 1: 16 000 und wurden dann nach einer Behandlungsdauer von 12, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden zugleich mit einigen unbehandelten Kontrolltieren fixiert, geschnitten und histologisch untersucht.

Die *Epidermis* spielt normalerweise beim Anlaufen der Regenerationsvorgänge eine wichtige Rolle. Schon 36 Stunden nach der Amputation zeigt sie Zeichen der Aktivierung. Sie wandelt sich aus einem sehr flachen Plattenepithel in ein hohes Zylinderepithel um, dessen plasmareiche Zellen 48—72 Stunden nach der Amputation grosse, vermutlich eiweissreiche (LEUCHTENBERGER und SCHRADER 1951) Kerne mit grossen Nucleolen, vermutlich beladen mit Ribonucleinsäure (BRACHET u. a.), bilden. Bei der Anhäufung dieser aktivierten Zellen spielt zunächst eine Zuwanderung von Zellen aus dem Stumpf eine Rolle, Mitosen sind anfänglich selten. Ferner darf aus entsprechenden Befunden an anderen Objekten geschlossen werden, dass von der Innenseite der aktivierten Epidermis intensive histo- (wohl vor allem proteo-) lytische Wirkungen ausgehen. Diese äussern sich auch bei unbehandelten *Xenopus*-larven im raschen Verschwinden von Bindegewebstrümmern, Zellresten und koaguliertem Blut aus dem Mesenchymraum unmittelbar unter der Epidermis der Regeneratsspitze. Insbesondere BROMLEY und ORECHOWITSCH haben für den regenerierenden Axolotlschwanz gezeigt, dass in den ersten drei Tagen nach der Amputation eine Protease, das Kathepsin, in der Regenerationszone stark zunimmt. Die Behandlung mit den Aminoketonen 5 oder 9 hemmt diese Aktivierung der Epidermis in den ersten drei Tagen sehr stark. Die Zuwanderung der Zellen zum Epidermisblastem ist verlangsamt. Ein hohes Epithel mit plasmareichen Zellen bildet sich mit einer Verspätung von 24—36 Stunden. Ebenso vergrössert sich das Kernvolumen verspätet und die Bildung der Nucleolen ist stark gehemmt. Der enzymatische Abbau des Detritus im Mesenchymraum geht nur zögernd vor sich. Somit sind alle Prozesse, die auf aktivierte Proteinbildung hindeuten (Vergrösserung der Nucleolen und Volumenzuwachs des Plasmas wie

der Kerne) stark gehemmt. Auch die Aktivität der Proteasen, die aus dem Tempo des Abbaues der Gewebetrümmer ersehen werden kann, ist gegenüber der Norm herabgesetzt. Damit wird deutlich, worin der histostatische Effekt der Aminoketone auf die Epidermis besteht. Reduzierte migratorische Aktivität (die ev. auch auf besonderen proteolytischen Leistungen der Zelle beruht) und

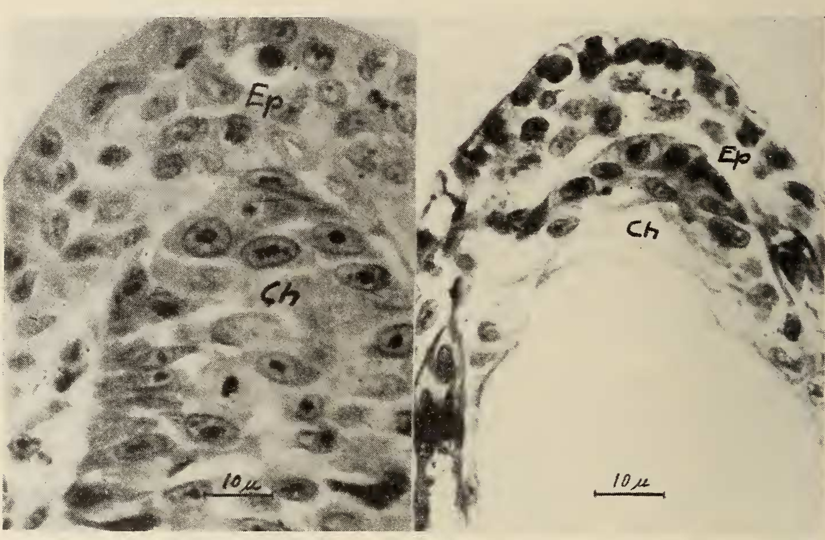


Abb. 1.

Längsschnitte durch 48 stündige Regenerationsblasteme von *Xenopus* Schwänzen. Vergr. 1000 ×. *a*) Unbehandelte Kontrolle mit grossen Kernen und Nucleolen im Chordablastem (Ch). Dicke Epidermis (Ep); *b*) Mit E_9 behandelter Keim, kleines zellarmes Blastem auf der Chordaspitze (Ch). Dünnes Epidermisblastem (Ep).

gehemmte Aktivierung des Proteinstoffwechsels. Durch diese Hemmung wird der Aufbau eines Epidermisblastems von normaler Grösse verhindert.

In analoger Weise wie die Epidermis reagiert auch die *Chorda* auf die Behandlung mit Aminoketonen. An der Amputationsstelle der Chorda der Kontrollen werden die Zellen der Chordascheide aktiviert. 36 Stunden nach der Amputation ist das abgeschnittene Chordaende durch eine kleine Blastemkappe zugewanderter Scheidenzellen bedeckt. Das Blastem nimmt in den folgenden Tagen an

Masse zu; das Zytoplasma ist stark basophil, die voluminösen Kerne besitzen grosse, stark basophile Nucleoli. Vom 6.—10. Tage erfolgt das Auswachsen des Regenerates, verbunden mit der histologischen Differenzierung des Chordagewebes. Die Aktivierung der Chordazellen wird durch die Einwirkung der Aminoketone ebenfalls

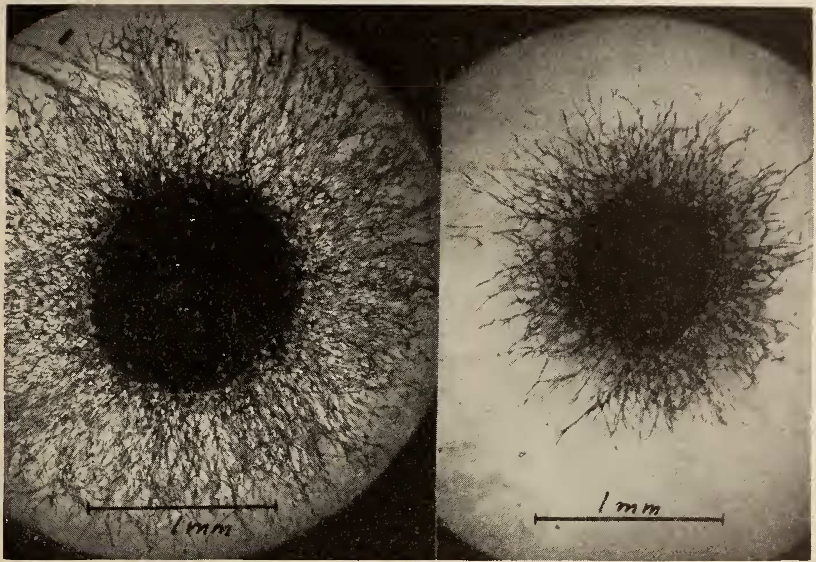


ABB. 2.

Kulturen von Hühnerherzfibroblasten 48 Stunden nach Auspflanzung. *a*) Unbehandelte Kontrolle; *b*) Kultur, der E_9 in 1: 750 zugesetzt worden war. Starke Hemmung der Zellwanderung.

sehr stark gehemmt. Die Aktivierung und Zuwanderung der Chordazellen ist 36—48 Stunden nach der Amputation sehr gering. Das gebildete Blastem ist klein, die Kerne besitzen, wenn überhaupt kleinere Nucleoli und ein kleineres Volumen.

Da das Einsetzen des Wachstums und der Differenzierung selbst bei den behandelten Keimen kaum verzögert wird, so können sich diese Vorgänge nur an einer wesentlich zu kleinen Anlage abspielen. Dementsprechend wird das gebildete Regenerat zu klein oder es ist überhaupt nicht im Stande auszuwachsen, da das Blastem die erforderliche Minimalgrösse nicht erreicht hat.

3. Die phasenspezifische Beeinflussung der Regeneration.

Das Beispiel der Aminoketone zeigt deutlich, dass diese Stoffe in erster Linie die Phase der Blastembildung treffen, während die mitotische Periode ebenso wie die Histogenese kaum verändert sind. Es scheint, als ob wichtige enzymatische Systeme, die bei der Aktivierung des Proteinstoffwechsels in der Epidermis wie in der Chorda beteiligt sind, selektiv blockiert würden. Diese Systeme sind in den späteren Phasen nicht mehr so aktiv oder zum mindesten nicht mehr so empfindlich. Hervorgehoben sei auch die Hemmung der migratorischen Aktivität. Denn diese wird durch die Aminoketone nicht nur bei der Regeneration sondern bei besonders gut wachsenden Hühnerherzfibroblasten betroffen, kaum aber bei langsam wachsenden [1]. Merkwürdigerweise wird durch stärkere Konzentrationen nur die Auswanderung von Zellen nicht aber ihre mitotische Aktivität gehemmt (Näheres s. Dettelbach). Dieser Umstand verdient besondere Beachtung, denn die migratorische Aktivität spielt wohl ganz allgemein (so auch bei der Regeneration wirbelloser Tiere, wie *Hydrozoen* oder *Planarien*) beim Zustandekommen des Regenerationsblastems eine wesentliche Rolle. Es sollte geprüft werden, wie weit die Zellen bei der Lösung aus ihrer bisherigen Ruhelage und bei der Wanderung zum neuen Ort besonderer enzymatischer Einwirkungen auf Proteidgallerten bedürfen, um sich einen Weg zu bahnen.

Die anschliessende Zellvermehrungsphase im Blastem kann nicht mehr durch Aminoketone, sondern vor allem durch die cytoklastische Wirkung des Colchicins getroffen werden, während die migratorische Periode durch das Colchicin nachweislich nicht geschädigt wird (Lüscher).

Aufschlussreich ist ferner der Umstand, dass die Phase unmittelbar vor der Histogenese der Regenerationsblasteme bei *Xenopus* durch Chinoxalinderivate selektiv gehemmt wird (Lehmann und Bretscher 1952). Das geht aus der phasenspezifischen Empfindlichkeit gegenüber der unterbrochenen Behandlung hervor. Ferner aus den histologischen Befunden, die wahrscheinlich machen, dass zahlreiche differenzierungsbereite Zellen der Blasteme kurz vor

[1] Die Versuche wurden von Prof. E. Hintzsche für uns am Kocher-Institut ausgeführt. Wir danken ihm sehr für seine bereitwillige Mitarbeit.

der Histogenese in der Ruhephase zu Grunde gehen, während die ablaufenden Mitosen ein völlig normales Bild zeigen. Es scheinen also in dieser Phase wieder andere biochemische Mechanismen im Vordergrund zu stehen, die wohl auf gewisse Chinoxaline, nicht aber auf Colchicin und nur wenig auf Aminoketone ansprechen.

Somit lassen unsere Befunde in ihrer Gesamtheit vermuten, dass bei den Regenerationsvorgängen die verschiedenen, morphogenetisch unterscheidbaren Phasen sich durch verschiedenartige metabolische Aktivitäten auszeichnen, die in mehr oder weniger selektiver Weise auf bestimmte chemische Einwirkungen reagieren können.

LITERATUR

1934. Bromley, N. W. & Orechowitsch, W. N.: *Ueber die Proteolyse in den regenerierenden Geweben.* Biochem. Z. *272*, 324.

1952. Dettelbach, H. R. *Histostatic und Cytostatic effects of some Aminoketones upon tail regeneration in Xenopus larvae.* Inaug. Diss. Bern (im Druck).

1950. Lehmann, F. E., Bretscher, A., Kühne, H., Sorkin, E., Erne, M. & Erlenmeyer, H.: *Ueber die chemischen und biologischen Eigenschaften einiger α-Aminoketone.* Helv. Chim. Acta *33*, 1217.

1952. Lehmann, F. E. & Bretscher, A.: *Wirkungsanalyse regenerationshemmender Stoffe mit Hilfe statistischer Methoden.* Helv. Physiol. Acta. *10*, 20.

1951. Leuchtenberger, C. & Schrader, F.: *Relationship between nuclear volumes, amount of intranuclear proteins and desoxyribosenucleic acid in various rat cells.* Biol. Bull. *101*, 95.

1946*a*. Lüscher, M.: *Die Hemmung der Regeneration durch Colchicin beim Schwanz der Xenopus-Larve und ihre entwicklungsphysiologische Wirkungsanalyse.* Helv. Physiol. Acta. *4*, 465.

1946*b*. —— *Die Wirkung des Colchicins auf die an der Regeneration beteiligten Gewebe im Schwanz der Xenopus-Larve.* Rev. Suisse Zool. *53*, 683.

1952. —— *Die Ursachen der tierischen Regeneration.* Exper. *8*, 80.